

Hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service as Express Mail, Airbill No. EV703273373US, in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: September 15, 2005 Signature:

Ava R. Brown
(Ava R. Brown)

Docket No.: 10112/005001
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Mingjai Su et al.

Application No.: 10/817,641

Confirmation No.: 6152

Filed: April 2, 2004

Art Unit: 1625

For: APORPHINE AND OXOAPORPHINE
COMPOUND AND PHARMACEUTICAL USE
THEREOF

Examiner: A. A. Owens

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign applications filed in the following foreign countries on the dates indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
PCT	PCT/CN03/00477	June 19, 2003

In support of this claim, a certified copy of each said original foreign application is filed herewith.


Application No.: 10/817,641

Docket No.: 10112/005001

Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 50-0591, under Order No. 10112/005001 from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: September 15, 2005

Respectfully submitted,

By  #45,079
T. Chyau Liang, Ph.D. THOMAS SCHERSER
Registration No.: 48,885
OSHA · LIANG LLP
1221 McKinney St., Suite 2800
Houston, Texas 77010
(713) 228-8600
(713) 228-8778 (Fax)

证 明

CERTIFICATE

本证明之附件是向中国专利局作为受理局提交的下列国际申请副本

TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY OF THE BELOW
TIFIED INTERNATIONAL APPLICATION THAT WAS FILED WITH THE
CHINESE PATENT OFFICE AS RECEIVING OFFICE

申请号: PCT/CN03/00477

INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER

申请日: 19.6月 2003(19.06.03)

INTERNATIONAL FILING DATE

名称: 阿朴芬及酮基阿朴芬化合物及其药物用途

INVENTION

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

中华人民共和国国家知识产权局局长

COMMISSIONER OF THE STATE INTELLECTUAL PROPERTY
OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

王景川

二零零五年六月二十三日

JUN 23. 2005

BEST AVAILABLE COPY

原件(提交) - 打印于 2003年06月19日 (19.06.2003) 星期四 10时49分29秒

0 0-1	由受理局填写 国际申请号.	PCT/CN 03/ 0 04 7 7
0-2	国际申请日	19. 6月 2003 (19. 06. 03)
0-3	受理局名称及 "PCT国际申请"	RO/CN 中华人民共和国国家知识产权局 PCT International Application
0-4 0-4-1	PCT/RO/101表格 PCT请求书 软件版本	PCT-EASY Version 2.92 (更新日期 01.04.2003)
0-5	请求 签字人请求按照专利合作条约的 规定处理本国际申请	
0-6	申请人指定的受理局	中国国家知识产权局 (RO/CN)
0-7	申请人或代理人的档案号	PT0305145
I	发明名称	阿朴芬及酮基阿朴芬化合物及其药物用途
II II-1 II-2 II-4zh II-4en II-5zh II-5en II-6 II-7	申请人 该人是: 是对下列国家的申请人: 名称 Name 地址: Address: 国籍: 居所:	申请人 (applicant only) 所有指定国 (all designated States) . 美时化学制药股份有限公司 LOTUS PHARMACEUTICAL CO., LTD. 中国台湾省台北市 大安区复兴南路一段200号4楼 106 1Fl., No.200, Sec.1, Fushing S. Rd., Da-an Chiu Taipei City, Taiwan 106 China 中国 CN 中国 CN
III-1 III-1-1 III-1-4zh III-1-4en III-1-5zh III-1-5en	申请人和/或发明人 该人是: 姓名: Name (LAST, First) 地址: Address:	发明人 (inventor only) 苏 铭嘉 SU, Mingjai 中国台湾省台北市 大安区温州街16巷12之1号4F 106 4Fl., No.12-1, Lane16, Wenjou St., Da-an Chiu Taipei City, Taiwan 106 China

RO/CN

III-2 III-2-1 III-2-4z h III-2-4e n III-2-5z h III-2-5e n	申请人和/或发明人 该人是: 姓名: Name (LAST, First) 地址: Address:	发明人 (inventor only) 李 水盛 LEE, Shoesheng 中国台湾省台北市 中正区水源路57号8F 100 8Fl., No.57, Shueiyuan Rd., Jungjeng Chiu Taipei City, Taiwan 100 China
IV-1 IV-1-1zh IV-1-1en IV-1-2zh IV-1-2en IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5 IV-1-5	代理人, 共同代表或通信地址 下列人员被委托为代表申请人对 主管国际单位办理事务的: 名称 Name 地址: Address: 电话号码: 传真号码: 电子邮址: 代理人登记号	代理人 (agent) 北京三友知识产权代理有限公司 BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD. 中国北京 北三环中路40号 100088 No.40 North Sanhuanzhonglu Road Beijing 100088 China 86-10-62041212 86-10-62041313 syp@san-you.com 11127
V V-1	国家的指定 地区专利 (其他保护类型(如有的话)注明 在所涉及指定国后的括号内)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及其他同时是哈拉雷协定缔约国和PCT缔约国的国家 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及其他同时是欧亚专利公约缔约国和PCT缔约国的国家 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及其他同时是欧洲专利公约缔约国和PCT缔约国的国家 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及其他同时是非洲知识产权组织成员国和PCT缔约国的国家
V-2	国家专利 (其他保护类型(如有的话)注明 在所涉及指定国后的括号内)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW

PCT请求书

原件(提交) - 打印于 2003年06月19日 (19. 06. 2003) 星期四 10时49分29秒

V-5	预防性指定声明 除在V-1, V-2和V-3项中所作的指定外, 申请人还按照细则4. 9 (b) 指定除下面V-6项所列出的国家外PCT所允许指定的所有国家, 申请人声明这些补充指定是以确认为条件, 并且自优先权日起15个月期限届满前尚未被确认的任何指定应认为被申请人在该期限届满时撤回。	
V-6	预防性指定的例外	无 (NONE)
VI	优先权	无 (NONE)
VII-1	选定的国际检索单位	中国国家知识产权局 (ISA/CN)
VIII	声明	声明数目
VIII-1	关于发明人身份的声明	-
VIII-2	关于申请人在国际申请日有权申请和被授予专利的声明	-
VIII-3	关于申请人于国际申请日有权要求在先申请的优先权的声明	-
VIII-4	发明人资格声明 (仅为指定美国目的)	-
VIII-5	关于不损害新颖性的公开及丧失新颖性的例外的声明	-
IX	清单	页数
IX-1	请求书 (包括声明页)	4
IX-2	说明书	24
IX-3	权利要求	4
IX-4	摘要	1
IX-5	附图	4
IX-7	共计	37
	附件	附以纸件
IX-8	费用计算页	✓
IX-9	单独委托书原件	✓
IX-17	PCT-EASY磁盘	-
IX-19	应与摘要一起公布的附图图号	
IX-20	国际申请所用语言	中文
X-1	申请人, 代理人或共同代表的签字	
X-1-1	名称	北京三友知识产权代理有限公司
X-1-2	代表法人的签字人姓名	黄健
X-1-3	身份	代理人

由受理局填写

10-1	据称的国际申请文件的实际收到日期	19. 6月 2003 (19. 06. 03)
------	------------------	--------------------------

PCT请求书

PT0305145

原件(提交) - 打印于 2003年06月19日 (19. 06. 2003) 星期四 10时49分29秒

10-2	附图:	
10-2-1	收到	
10-2-2	未收到	
10-3	由于随后在期限内收到补充国际申请的文件或附图, 更改的实际收到日期	
10-4	在期限内收到根据PCT第11(2)条所进行的改正的日期	
10-5	国际检索单位	ISA/CN
10-6	检索本的传送被推迟到收到检索费之后	

由国际局填写

11-1	国际局收到登记本的日期	
------	-------------	--

PCT (附件-费用计算页)

原件(提交) - 打印于 2003年06月19日 (19.06.2003) 星期四 10时49分29秒

(本页不是国际申请的一部分, 不计算在页数内)

0	由受理局填写			
0-1	国际申请号.	PCT/CN 03/ 0 04 7 7		
0-2	受理局日期章	19. 6月 2003 (19. 06 03)		
0-4	PCT/RO/101表格 (附录)			
0-4-1	PCT费用计算页 软件版本	PCT-EASY Version 2.92 (更新日期 01.04.2003)		
0-9	申请人或代理人的档案号	PT0305145		
2	申请人	美时化学制药股份有限公司		
12	计算应缴费用	费用数额/数目	总额 (以当地货币计算相当于CHF)	总额 (CNY)
12-1	传送费 T	⇒		500
12-2-1	检索费 S	⇒		1,500
12-2-2	International search to be carried out by	CN		
12-3	国际费			
	基本费			
	(前30页) b1	650 CHF		
12-4	超过30页的页数	7		
12-5	附加费数额 (X)	15 CHF		
12-6	附加费总额 b2	105 CHF		
12-7	b1 + b2 = B	755 CHF		
12-8	指定费			
	本国际申请所含指定数目	95		
12-9	应缴指定费数目 (最多为5)	5		
12-10	指定费数额 (X)	140 CHF		
12-11	指定费总额 D	700 CHF		
12-12	PCT-EASY 费用减免 R	-200 CHF		
12-13	国际费总额 (B+D+R) I	⇒	1,255	
12-17	应缴费用总额 (T+S+I+P)	⇒	1,255	2,000
12-19	缴费方式:	授权从帐户扣款		
12-20	帐户授权			
	受理局:	中国国家知识产权局 (RO/CN)		
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above.	✓		
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓		
12-21	帐号	000000		
12-22	日期	2003年06月19日 (19.06.2003)		

PCT (附件-费用计算页)

PT0305145

原件(提交) - 打印于 2003年06月19日 (19.06.2003) 星期四 10时49分29秒

12-23	姓名(或名称)及签字	北京三友知识产权代理有限公司
-------	------------	----------------

确认记录及备注

13-2-2	确认信息 国家的指定	绿色? 可作更多指定。下列国家未被指定: US 。请核实。
13-2-3	确认信息 姓名/名称	绿色? 申请人 1: 电话号码遗漏。
		绿色? 申请人 1: 传真号码遗漏。
13-2-4	确认信息 优先权	绿色? 未要求在先申请的优先权。请核实。
13-2-7	确认信息 清单	绿色? 未指定与摘要一起公布的附图, 请核实。
13-2-8	确认信息 费用	绿色? 请确认所用的费用表是最新版本。
13-2-9	确认信息 缴费	绿色? 请确保您在所选定的受理局具有有效的帐户。
13-2-11	确认信息 由受理局/国际局填写	绿色? 请核实电子数据与打印表格的一致性。

阿朴芬及酮基阿朴芬化合物及其药物用途

技术领域

5 本发明涉及一种可用于治疗局部缺血性疾病的化合物，特别是关于一种由于其保存或增加内皮性一氧化氮合成酶(eNOS)的机制而可被用来制备预防及治疗局部缺血性疾病药物的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物。

背景技术

10 随着社会的进步，科技的日新月异，使得人们的寿命越来越长，但是也因为年龄、饮食、肥胖、缺乏运动或生活压力太大等许多原因而产生疾病，其中，缺血性疾病做为人类死亡的主因之一，更是造成残障的主要因素，使个人、家庭、社会及国家蒙受重大冲击与损失，所以对于缺血性疾病的预防更显得重要。

15 在缺血性疾病中的缺血性中风因具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高等特点，进而成为中老年人的多发病、常见病。缺血性中风是指供应脑部血液的颅外或颅内动脉发生闭塞性病变，造成脑组织缺血缺氧，出现一系列的急性临床症状，若未能及时恢复供血，神经细胞、胶质细胞和血管将坏死，形成脑梗死，包括脑血栓形成和脑栓塞。

20 对于缺血性中风而言，真正能“打通血管”的药物--血栓溶解剂(Tissue Plasminogen Activator)，是目前美国食品和药品管理局批准的唯一有效的血栓栓塞中风治疗剂，台湾在2001年已通过卫生署的核准。然而，其容易伴有脑出血的并发症，且在治疗时效上有非常严格的限制，即所谓“黄金时段”，于中风后三小时内可以采取静脉注射，或六小时内配合脑血管摄影在动脉内注射直接将血栓溶解。其它传统“通血路”的药物，如抗凝
25 血剂，血小板抑制剂，作用仅是防止血栓继续生成扩大，无法将已阻塞的

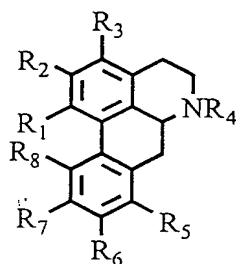
血栓溶解掉而打通血路。此外，脑组织保护剂的使用（如 Piracetam）也是一种相当有希望的治疗方法，不过这种药剂最好也是在中风后六小时内立刻给予，才有明显的疗效。近年来的研究发现，血栓溶解剂可增强 N-甲基 D-天冬氨酸（NMDA）受体的信息传递，引起神经细胞死亡，使病人出现记忆丧失，体温下降等副作用，使得利用血栓溶解剂来治疗缺血性中风的功效大打折扣。

发明内容

因此，本发明针对上述技术现状的困扰，提出一类以保存或增加内皮性一氧化氮合成酶（eNOS）的机制用来制备治疗局部缺血性疾病药物的化合物，以有效克服现有技术的缺憾。

本发明的目的在于提供一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，该化合物具有保存或增加内皮性一氧化氮合成酶（eNOS）作用机制，可用以制备预防及治疗局部缺血性疾病的药物，以达到有效治疗缺血性疾病的功效。

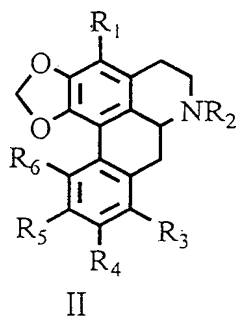
为达到上述目的，本发明提供的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物具有式 I 结构：



I

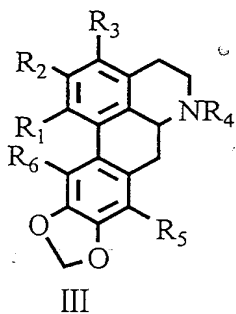
其中， R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr； R_3 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl（氧酰基）、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN； R_4 选自 allyl（烯丙基）或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$ ； R_8 选自 H、OH、OMe。

本发明提供的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 也可具有式 II 结构:



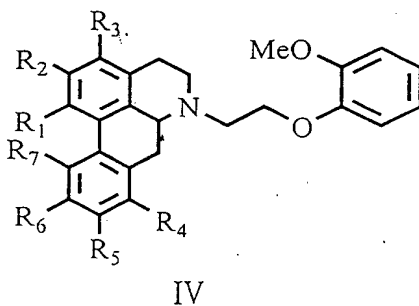
- 其中, R_1 、 R_3 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN;
 5 R_2 选自 allyl 或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$; R_4 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^iPr 、 O^tPr ; R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

本发明的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 也可具有式 III 结构:



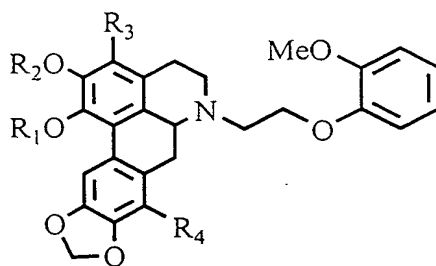
- 10 其中, R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^iPr 、 O^tPr ; R_3 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN; R_4 选自 allyl 或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$; R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

本发明还提供了具有式 IV 结构的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物:



- 15 其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^iPr 、 O^tPr ; R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN; R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

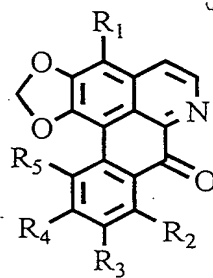
本发明进一步提供了一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，所述化合物具有式 V 结构：



V

5 其中， R_1 、 R_2 选自 H、acyl、Me、Et、 n Pr 或 i Pr； R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN。

本发明还提供了一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，所述化合物具有式 VI 结构：

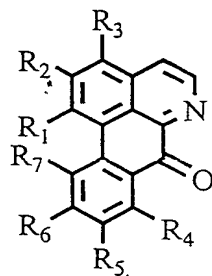


VI

10

其中， R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NO_2 或 CN； R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 n Pr、或 i Pr；及 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

本发明还提供了一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，所述化合物具有式 VII 结构：

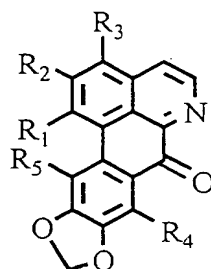


VII

15

其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr 或 OⁱPr; R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NO₂ 或 CN; R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

本发明还提供了一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 所述化合物具有式 VIII 结构:



VIII

其中, R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr 或 OⁱPr; R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NO₂ 或 CN; R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

本发明的化合物可用于制备治疗哺乳动物或人类的缺血性疾病的药物, 具体地, 所述缺血性疾病包括缺血性脑中风、缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病及缺血性肠病变等疾病。

本发明提供了上述用以制备预防及治疗局部缺血性疾病药物的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 该化合物利用使血管放松并扩张的方法, 比现有技术利用将已阻塞的血栓溶解掉而打通血路的方法更有效。所述的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物在治疗缺血性疾病时, 不会使病人出现记忆丧失、体温下降等副作用, 使治疗过程可达到更完美的功效。

本发明还揭示了上述阿朴芬及酮基阿朴芬化合物预防和治疗局部缺血性疾病中的药物用途, 更进一步揭示上述阿朴芬及酮基阿朴芬化合物用于治疗哺乳动物或人类的缺血性疾病的药物用途。

本发明还提供了可用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物, 其包括治疗有效量的上述阿朴芬及酮基阿朴芬化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

下面藉由具体实施方案对本发明的内容详加说明，以利阅读者更容易了解本发明的目的、技术内容、特点及其功效；但不应理解为对本发明的可实施及保护范围的任何限定。

5 附图说明

图 1 为药效实验中第一组及第二组的实验结果比较曲线图。

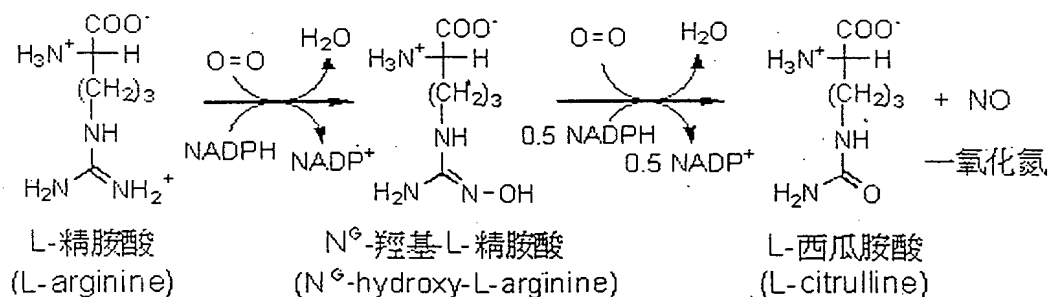
图 2 为药效实验中第一组及第三组的实验结果比较曲线图。

图 3 为使用本发明的力瑞得宁 (liriodenine) 于局部缺血 30 分钟后且经 2 小时再灌流作用后的 eNOS 蛋白与 α -微管素表现的效果示意图。

10 图 4 为使用本发明的力瑞得宁 (liriodenine) 于人的脐带静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 的 eNOS 蛋白表现的效果示意图。

具体实施方式

人体血管组织能自行合成一氧化氮 (nitric oxide, NO)，而一氧化氮可使血管扩张，因此与血压调节有密切关系。其中，内生性一氧化氮在血管平滑肌的舒张作用中扮演了重要的角色，在离体主动脉环、局部血管床及全身实验中，急性阻断 NO 生成均会导致血管收缩及血压升高。而在哺乳动物的体内中，一氧化氮的制造过程是由 L-精胺酸 (L-arginine) 在一氧化氮合成酶 (NOS) 的催化下，经过中间产物转换成 L-西瓜胺酸 (L-citrulline) 和 NO，如下所示：

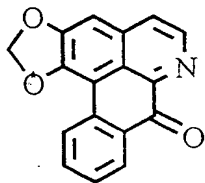


NOS 主要分成三类，包含神经性 (neuronal NOS, 或 nNOS、type I NOS)、

诱导性(inducible NOS, 或 iNOS、type II NOS)及内皮性(endothelial NOS, 或 eNOS、type III NOS), 其中, eNOS 负责调节血管张力, 而一氧化氮传导信息的功能和作用机制因其出自的地方而不同。eNOS 主要功能有三种:

- (1) 在神经突触是当作神经传导因子, 和脑部学习及记忆有关;
- (2) 在血管内皮是使血管的平滑肌细胞松弛而扩张血管, 可以降低血压; 及
- (3) 在巨噬细胞可损坏肿瘤细胞而将其杀死或停止其繁殖。另外, nNOS 和 eNOS 是组合式, 需要钙离子和调钙蛋白首先组合, 然后再与 nNOS 或 eNOS 组合产生催化作用; iNOS 是诱发式, 不需要钙离子和调钙蛋白, 细胞素可直接诱发 iNOS 产生催化作用。由于不需要钙离子和调钙蛋白, iNOS 常开始诱发就不可停止, 可以作用几个小时, 造成制造一氧化氮过度, 使一氧化氮变成有害物质。本发明之前的一些化合物利用保存或增加 eNOS 的机制的研究大多集中于治疗心脏血管疾病(如心律不齐, Su MJ, et al, Drug Development Research, 2001, 52: 446-453), 而在本发明中, 将透过一些新型化合物, 利用此机制应用在预防及治疗中风等缺血性疾病方面, 以下将说明利用此机制治疗缺血性疾病的方法与结果。

本发明提供了一种用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 其利用保存或增加内皮性一氧化氮合成酶(eNOS)的机制来达到预防及治疗局部缺血性疾病的功效, 此化合物可为力瑞得宁(liriodenine), 在此作为式 VI 化合物的其中之一作为验证本发明功效的优选实施例, 如下所示:



将此 liriodenine 化合物施用在雄性大鼠(Male Sprague Dawley rats)身上, 观察 liriodenine 对大鼠脑动脉阻塞性的脑缺血的作用。首先, 将大鼠经由中脑血管动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制造

永久性脑缺血，接着于中脑动脉阻塞后的 0、6、24、48 及 54 小时，静脉注射（IV 途径）5 ml/kg 的溶媒（0.9% NaCl）作为第一实验组（赋形剂对照组）、由静脉注射 0.1 mg/kg 的 liriodenine 作为第二实验组（PT#1010853-ADD (NTU-12) (NTU-106)），以及由静脉注射 0.1 mg/kg 的 N-甲基 D-天冬氨酸（NMDA）受体阻断剂 MK-801 作为第三实验组，每组均利用六只大鼠进行实验，每只大鼠在注射药物前及注射药物后 15 分钟由肛门量测体温，且在中脑动脉阻塞后第 4 天将每只大鼠断头处死并进行脑部切片，再以 2% 的甲酚紫染色，记录每片切片因缺血损伤的面积及体积，结果如表 1、表 2 及表 3 所示，将三者数据整理比较如表 4 所示，也可将实验结果利用曲线来表示，如图 1 所示，为本实验中第一组及第二组之实验结果比较曲线图，如第二图所示，为本实验中第一组及第三组的实验结果比较曲线图。由这些表及曲线图的揭示可以发现利用本发明进行缺血性中风治疗具有明显减少缺血损伤体积及面积的功效，而且与现正大力研究的中风治疗剂 MK-801 减少的量比较大得多。体温方面结果如表 5、表 6 及表 7 所示，和第一组的实验结果比较，本发明不会造成体温的大幅改变，而 MK-801 却产生了体温下降的不良反应。

接着，利用图 3 及图 4 所示实验结果验证化合物 liriodenine 可保护 eNOS 或促进 eNOS 的产生，进而达到预防及治疗局部缺血性疾病的目的是。

如图 3 所示，为使用本发明的 liriodenine 对大鼠心脏局部缺血 30 分钟后，再经 2 小时灌流作用后的 eNOS 蛋白所表现的效果示意图，并有 α -微管素（ α -tubulin）的表现做为标准量化的指标。在此图式中，a 图表示小鼠心脏在正常状态下的 eNOS 表现与 α -微管素表现；b 图表示将心脏左前降枝冠状动脉（LAD）结扎并以含赋形剂（vehicle）溶液再灌流的非阻塞区域的 eNOS 表现与 α -微管素表现；c 图为将心脏左前降枝冠状动脉结扎并以赋形剂再灌流的阻塞区域的 eNOS 表现与 α -微管素表现；d 图为将心脏左前降枝冠状动脉结扎并以含 $1\mu\text{M}$ 的 liriodenine 溶液再灌流的非阻塞区域的 eNOS 表现与 α -微管素表现；以及 e 图则为将心脏左前降枝冠

状动脉结扎并以含 $1\mu\text{M}$ 的 liriiodenine 溶液再灌流的阻塞区域的 eNOS 表现与 α -微管素表现。由该等 eNOS 相对于 α -微管素的表现即可得知，利用含 liriiodenine 溶液进行再灌流可使心脏 eNOS 的表现接近正常值，足以证明本发明化合物如 liriiodenine 有促进 eNOS 的表现或使其表现量维持恒定的功效。

如图 4 所示，此为在去除血清后使用本发明的 liriiodenine 对于人脐带静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 的 eNOS 蛋白表现的效果示意图。其中的 SD: 不等数分离 (segregation distorter, SD) 现象，SD 指的是自然族群里出现的一个染色体。其为利用密度影像软件对相关蛋白增加级数进行定量，图中显示的结果为具有相同结果的三个独立实验的代表图形，并以 α -微管素表现量做为标准量化后，去除血清的 HUVEC eNOS 的量化恒定为 1，其中 $P < 0.05$ ，意思为相比较于去除血清的 HUVEC eNOS 有显著性差异。由图 4 的实验结果可知经由 liriiodenine 0.3 及 $1\mu\text{M}$ 浓度处理的脐带静脉血管内皮细胞的 eNOS 可明显增加，此结果证明 liriiodenine 有保护 eNOS 或促进 eNOS 产生的功效。

因此，本发明利用另一机制即增加内皮型 NO 合成酶 (eNOS) 以维持内皮功能完整，包括抑制白细胞和血小板粘附及调节血张力等。转基因动物模型更明确地显示了它们各自在脑缺血中的作用，在局部性脑缺血情况下，eNOS 基因剔除 (knockout) 的小鼠形成的梗塞大，而缺少 iNOS 基因的小鼠与野生型相比梗塞大为缩小，nNOS 基因剔除 2 (knockout2) 的小鼠形成的梗塞也小。使得本发明在减少小鼠脑缺血体积和面积的同时，并不会造成如 NMDA 受体阻断剂 MK801 的这些副作用。

再者，上述化合物除了可用于治疗小鼠外，对于其它哺乳动物及人类等的缺血性疾病也有相同的功效，而在缺血性疾病中除了缺血性脑中风外，对于缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病或缺血性肠病变等疾病亦同样具有相同的功效。

表 1

赋形剂对照组 MCAO 大鼠的缺血损伤面积 (0.9% NaCl, 5 ml/kg × 6, IV)							
切片 #	每一实验动物的阻塞面积 (mm ²)						X±SEM
	1	2	3	4	5	6	N=6
BW (g)	250	240	240	250	260	270	
1	1.52	0	0	0	1.20	0	0.45±0.29
2	5.05	0	0	0	4.20	0	1.54±0.98
3	8.50	1.18	3.16	0	5.11	4.57	3.75±1.24
4	10.80	4.50	4.62	2.68	8.25	7.17	6.34±1.21
5	12.60	8.71	6.25	4.44	9.45	9.28	8.45±1.15
6	15.00	9.38	8.68	6.49	13.00	9.97	10.42±1.26
7	15.90	11.00	9.67	9.23	15.30	12.30	12.23±1.15
8	16.00	12.00	10.80	10.30	16.90	13.00	13.17±1.11
9	17.00	12.70	11.50	12.20	17.90	13.10	14.07±1.10
10	17.60	14.20	11.60	15.30	17.60	15.30	15.27±0.92
11	16.60	15.60	12.70	15.70	16.60	15.60	15.47±0.59
12	15.80	13.70	12.80	15.80	15.90	17.70	15.28±0.72
13	13.50	13.60	13.00	16.80	15.70	18.10	15.12±0.85
14	13.30	12.60	12.70	14.80	13.40	14.70	13.58±0.39
15	11.60	11.70	11.70	14.40	13.30	14.70	12.90±0.58
16	11.50	11.10	11.50	14.20	12.70	13.90	12.48±0.54
17	11.20	11.00	11.30	14.10	12.20	10.80	11.77±0.51
18	10.00	10.90	11.20	11.80	10.70	10.80	10.90±0.24
19	9.97	10.80	11.10	11.50	10.50	10.40	10.71±0.22
20	9.96	10.70	11.00	11.00	9.82	9.90	10.40±0.23
21	9.70	10.60	10.30	11.00	8.73	9.80	10.02±0.33
22	9.60	9.72	9.76	10.50	8.68	8.97	9.54±0.26
23	8.77	8.80	9.50	9.60	7.47	8.75	8.81±0.31
24	8.74	8.44	8.74	8.86	6.30	8.35	8.24±0.40
25	8.38	8.31	7.83	8.60	3.95	7.10	7.36±0.72
26	7.96	7.73	7.12	8.38	3.82	6.55	6.93±0.67
27	5.81	7.70	6.82	6.45	1.59	6.06	5.74±0.87
28	5.73	7.41	6.62	5.87	0	4.96	5.10±1.07
29	5.00	6.71	4.95	4.00	0	0.94	3.60±1.06
30	3.09	2.61	3.83	3.11	0	0.58	2.20±0.63
Total mm ²	316.18	273.40	260.75	277.11	280.27	283.35	281.84±7.58
Total mm ³	123.31	106.63	101.69	108.07	109.31	110.51	109.92±2.96
%Inh.							

表 2

PT#1010853-ADD 组 (NTU-12) (NTU-106) (0.1mg/kg × 6, IV) 之 MCAO 大鼠的缺血损伤面积							
切片#	每一实验动物之阻塞面积 (mm ²)						X±SEM
BW (g)	1	2	3	4	5	6	N=6
	230	240	240	250	240	230	
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	3.86	2.61	0	0	1.97	1.41±0.68
6	0	6.38	4.31	0	0	2.95	2.27±1.11
7	0.93	8.47	5.33	0	0	4.30	3.17±1.40
8	3.20	8.55	6.94	0	0	8.17	4.48±1.61
9	4.52	9.10	7.91	0	0.61	7.68	4.97±1.60
10	4.73	9.11	9.92	0	2.44	7.10	5.55±1.58
11	8.54	10.30	10.50	1.75	6.97	7.09	7.53±1.31
12	9.95	12.60	10.90	2.80	10.70	6.22	8.86±1.49
13	10.60	12.00	13.80	3.44	11.30	5.23	9.39±1.67
14	10.70	11.20	10.71	3.56	11.40	4.93	8.75±1.44
15	11.50	10.70	9.99	3.84	12.54	3.67	8.71±1.60
16	12.10	10.60	9.83	5.92	14.30	2.48	9.20±1.76
17	12.40	10.50	9.70	6.59	14.50	1.17	9.14±1.93
18	13.30	10.40	9.68	7.33	15.10	0	9.30±2.17
19	13.90	10.40	9.55	7.37	15.70	0	9.49±2.26
20	14.80	9.91	9.10	9.30	14.60	0	9.62±2.20
21	15.20	9.31	9.08	8.56	14.29	0	9.41±2.21
22	14.20	9.14	8.92	8.13	12.50	0	8.82±2.01
23	13.90	9.01	8.85	7.79	11.44	0	8.50±1.92
24	12.10	7.90	6.89	7.45	11.10	0	7.57±1.74
25	10.50	7.86	6.71	6.76	11.00	0	7.14±1.61
26	10.40	7.80	6.50	6.23	10.70	0	6.94±1.59
27	10.30	7.68	6.05	6.16	10.60	0	6.80±1.58
28	9.74	6.98	5.48	6.08	9.27	0	6.26±1.43
29	8.03	5.88	4.80	5.35	8.79	0	5.47±1.27
30	7.94	4.30	4.40	3.95	4.98	0	4.26±1.04
Total mm ²	243.48	229.94	208.46	118.36	234.83	62.96	183.00±30.43
Total mm ³	94.96	89.68	81.30	46.16	91.58	24.55	71.37±11.87*
%Inh	13.61	18.41	26.04	58.01	16.68	77.67	35.07±10.80

表 3

MK-801 组 (0.1mg/kg × 6, IV) 之 MCAO 大鼠的缺血损伤面积							
切片#	每一实验动物之阻塞面积 (mm ²)						X±SEM
	1	2	3	4	5	6	N=6
BW (g)	220	250	250	260	240	270	
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1.91	0	0	0	0	0.32±0.32
3	0	3.53	0	0	0	0.97	0.75±0.58
4	0	5.86	0	0	0	3.76	1.60±1.05
5	1.99	6.74	0	0	2.52	5.58	2.81±1.15
6	4.33	8.02	0	0	4.32	7.78	4.08±1.44
7	5.86	10.50	2.74	0	7.54	11.10	6.29±1.78
8	6.97	11.90	5.11	1.18	9.83	11.70	7.78±1.71
9	8.63	12.30	6.39	2.98	13.90	12.00	9.37±1.70
10	10.60	12.80	7.72	4.32	12.20	12.40	10.01±1.37
11	12.80	14.00	8.21	5.78	12.00	11.70	10.75±1.27
12	12.90	12.20	8.81	5.24	10.70	10.20	10.01±1.12
13	13.90	10.80	8.93	4.73	10.10	10.10	9.76±1.22
14	15.00	10.80	10.10	4.04	10.10	9.94	10.00±1.43
15	12.80	10.70	9.59	2.64	10.00	9.74	9.24±1.41
16	12.80	10.20	8.70	0	9.84	8.83	8.40±1.78
17	12.70	9.82	8.20	0	9.66	8.82	8.20±1.76
18	12.00	9.65	8.11	0	9.10	8.81	7.95±1.68
19	11.90	9.42	7.78	0	9.05	8.68	7.81±1.66
20	11.30	9.35	7.74	0	9.01	8.03	7.57±1.60
21	10.70	9.08	7.66	0	8.67	8.00	7.35±1.53
22	10.10	9.04	7.31	0	8.60	7.92	7.16±1.48
23	10.10	8.81	7.22	0	8.45	7.76	7.06±1.47
24	9.65	8.68	6.80	0	8.16	7.72	6.84±1.42
25	9.64	8.44	6.65	0	8.14	7.30	6.69±1.40
26	8.88	8.01	5.95	0	7.66	6.87	6.23±1.31
27	8.45	7.77	3.80	0	7.33	6.40	5.63±1.30
28	8.44	7.68	3.47	0	7.17	6.00	5.46±1.30
29	7.98	5.38	3.09	0	5.31	5.31	4.51±1.10
30	3.89	5.02	3.03	0	4.08	2.94	3.16±0.70
Total mm ²	254.31	258.41	163.11	30.91	223.44	226.36	192.76±35.23
Total mm ³	99.18	100.78	63.61	12.05	87.14	88.28	75.17±13.74*
%Inh.	9.77	8.32	42.13	89.04	20.72	19.69	31.61±12.50

表 4

(总结)					
计算实验化合物在 MCAO 大鼠脑中缺血损伤总体积的减少量					
治疗	途径	剂量	小鼠 数目 N	阻塞体积 ($X \pm SEM$ mm ³)	% Inh. ($X \pm SEM$)
赋形剂对照	IV	5ml/kg × 6	6	109.92 ± 2.96	-
PT#1010853-ADD (NTU-12)	IV	0.1mg/kg × 6	6	71.37 ± 11.87*	35.07 ± 10.80
(NTU-106)					
MK-801	IV	0.1mg/kg × 6	6	75.17 ± 13.74*	31.61 ± 12.50

*P<0.05

表 5

在化合物治疗前 0 分钟 (Pre) 及治疗后 15 分钟 (Post) 的大鼠体温 (°C)								
治疗	途径	N	0 小时给药			6 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
赋形剂 (5ml/kg)	IV	1	37.9	36.0	-1.9	37.4	37.9	0.5
	IV	2	38.1	36.8	-1.3	37.6	38.4	0.8
	IV	3	37.9	36.5	-1.4	37.3	38.0	0.7
	IV	4	38.4	37.8	-0.6	38.1	36.4	-1.7
	IV	5	38.1	38.7	0.6	37.3	38.0	0.7
	IV	6	37.5	36.1	-1.4	37.9	37.8	-0.1
	X		38.0	37.0	-1.0	37.6	37.8	0.1
	SEM		0.1	0.4	0.4	0.1	0.3	0.4
治疗	途径	N	24 小时给药			30 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
赋形剂 (5ml/kg)	IV	1	38.3	38.0	-0.3	37.7	37.2	-0.5
	IV	2	38.1	37.9	-0.2	37.7	38.2	0.5
	IV	3	37.6	36.2	-1.4	37.9	37.5	-0.4
	IV	4	38.2	37.5	-0.7	37.3	37.9	0.6
	IV	5	37.9	37.3	-0.6	38.1	37.8	-0.3
	IV	6	38.0	37.9	-0.1	37.6	38.0	0.4
	X		38.0	37.5	-0.5	37.7	37.8	0.1
	SEM		0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2
治疗	途径	N	48 小时给药			54 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
赋形剂 (5ml/kg)	IV	1	37.9	37.0	-0.9	37.9	38.0	0.1
	IV	2	38.0	37.5	-0.5	37.6	37.9	0.3
	IV	3	37.4	38.0	0.6	38.2	38.1	-0.1
	IV	4	37.3	38.5	1.2	38.7	39.0	0.3
	IV	5	37.1	37.7	0.6	38.5	38.3	-0.2
	IV	6	37.6	37.5	-0.1	37.7	38.0	0.3
	X		37.6	37.7	0.2	38.1	38.2	0.1
	SEM		0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1

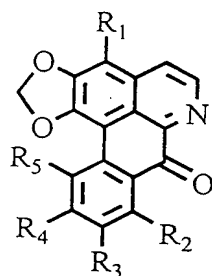
表 6

在化合物治疗前 (Pre) 0 分钟及治疗后 (Post) 15 分钟的大鼠体温 (°C)								
治疗	途径	N	0 小时给药			6 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
PT#1010853-ADD (NTU-12) (NTU-106) (0.1mg/kg × 6)	IV	1	37.0	36.3	-0.7	37.8	38.3	0.5
	IV	2	38.0	37.1	-0.9	37.9	38.5	0.6
	IV	3	37.0	37.6	0.6	38.3	38.3	0
	IV	4	36.9	37.9	1.0	38.2	38.6	0.4
	IV	5	37.4	37.1	-0.3	38.1	37.8	-0.3
	IV	6	37.5	36.9	-0.6	37.5	38.4	0.9
	X		37.3	37.1	-0.1	38.0	38.3	0.3
	SEM		0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2
治疗	途径	N	24 小时给药			30 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
PT#1010853-ADD (NTU-12) (NTU-106) (0.1mg/kg × 6)	IV	1	37.6	36.8	-0.8	38.5	37.9	-0.6
	IV	2	38.6	38.2	-0.6	37.7	37.7	0
	IV	3	38.1	37.9	-0.2	37.9	38.3	0.4
	IV	4	38.0	37.8	-0.2	38.9	38.4	-0.5
	IV	5	38.0	37.7	-0.3	38.3	38.0	-0.3
	IV	6	37.8	38.0	0.2	38.0	37.9	-0.1
	X		38.0	37.7	-0.3	38.2	38.1	-0.2
	SEM		0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
治疗	途径	N	48 小时给药			54 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
PT#1010853-ADD (NTU-12) (NTU-106) (0.1mg/kg × 6)	IV	1	37.9	37.5	-0.4	37.9	38.2	0.3
	IV	2	38.2	38.0	-0.2	37.5	38.0	0.5
	IV	3	38.2	37.6	-0.6	38.0	37.6	-0.4
	IV	4	38.5	38.1	-0.4	38.0	38.2	0.2
	IV	5	37.7	38.0	0.3	37.4	37.8	0.4
	IV	6	38.2	38.0	-0.2	37.7	38.0	0.3
	X		38.1	37.9	-0.3	37.7	38.0	0.2
	SEM		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

表 7

在化合物治疗前 0 分钟及治疗后 15 分钟的大鼠体温 (°C)								
治疗	途径	N	0 小时给药			6 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
MK-801 (0.1mg/kg × 6)	IV	1	39.0	36.5	-2.5	38.1	38.6	0.5
	IV	2	38.3	35.9	-2.4	37.8	37.5	-0.3
	IV	3	37.9	35.4	-2.5	37.7	37.7	0
	IV	4	38.7	36.1	-2.6	37.8	37.7	-0.1
	IV	5	36.8	36.0	-0.8	37.7	37.3	-0.4
	IV	6	37.1	35.6	-1.5	38.0	38.7	0.7
	X		38.0	35.9	-2.0	37.8	37.9	0.1
	SEM		0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2
治疗	途径	N	24 小时给药			30 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
MK-801 (0.1mg/kg × 6)	IV	1	37.7	38.2	0.5	37.0	37.2	0.2
	IV	2	37.5	37.2	0.3	37.7	38.0	0.3
	IV	3	37.6	37.5	-0.1	37.3	38.2	0.9
	IV	4	37.8	38.0	0.2	37.9	37.9	0
	IV	5	37.9	37.3	-0.6	38.1	37.5	-0.6
	IV	6	37.3	36.9	-0.4	37.4	38.2	0.8
	X		37.8	37.5	0	37.6	37.8	0.3
	SEM		0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
治疗	途径	N	48 小时给药			54 小时给药		
			Pre	Post	Δ	Pre	Post	Δ
MK-801 (0.1mg/kg × 6)	IV	1	38.0	37.3	-0.7	37.8	38.5	0.7
	IV	2	38.0	37.3	-0.7	37.5	38.1	0.6
	IV	3	37.5	37.2	-0.3	37.4	38.0	0.6
	IV	4	37.7	38.4	0.7	37.9	39.0	1.1
	IV	5	37.7	38.0	0.3	37.7	37.6	-0.1
	IV	6	37.3	36.9	-0.4	37.7	36.8	-0.9
	X		37.7	37.5	-0.2	37.7	38.0	0.3
	SEM		0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3

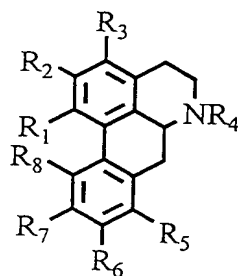
另外, 前述用以保存或增加内皮性一氧化氮合成酶 (eNOS) 的机制, 并用以预防及治疗局部缺血性疾病的式 VI 化合物:



VI

除了 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及 R_5 皆为 H 之外, R_1 及 R_2 可为 OH、OMe、F、Cl、Br、 NO_2 或 CN; R_3 及 R_4 可为 OH、OEt、 O^nPr 、 O^iPr 或 O-acyl; 且 R_5 可为 OH 或 OMe, 以上不同的化合物皆可达到对于人类或其它哺乳类动物预防与治疗缺血性疾病的功效。

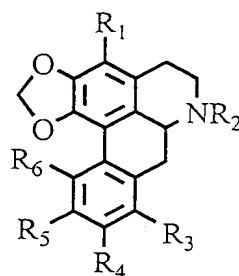
除了上述式 VI 化合物之外, 用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物亦可为式 I 化合物:



I

其中, R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_7 为 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 或 O^iPr ; R_3 、 R_5 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN; R_4 为 allyl 或 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 且 $n \geq 0$; R_8 为 H、OH、OMe。

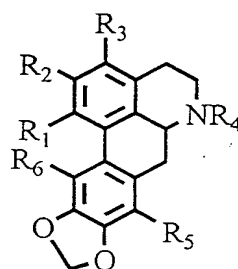
用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物亦可为式 II 化合物:



II

其中, R_1 、 R_3 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN; R_2 为 allyl 或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$; R_4 、 R_5 为 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 或 O^iPr ; 5 及 R_6 为 H、OH、O-acyl、OMe 等。

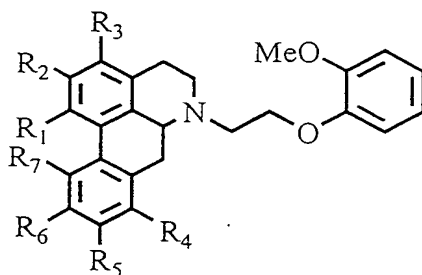
用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物又可为式 III 化合物:



III

10 其中, R_1 、 R_2 为 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 或 O^iPr ; R_3 、 R_5 为 H、OH、O-acyl、OMe、Cl、Br、 NH_2 、 NO_2 或 CN; R_4 为 allyl 或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$; 及 R_6 为 H、OH、O-acyl、OMe。

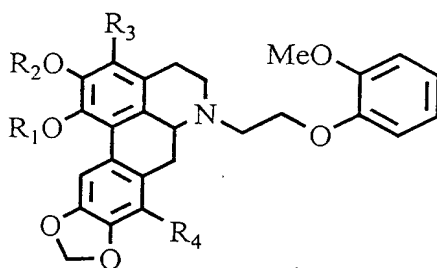
用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物又可为式 IV 化合物:



IV

其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 为 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr; R_4 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN; R_7 为 H、OH、O-acyl、OMe。

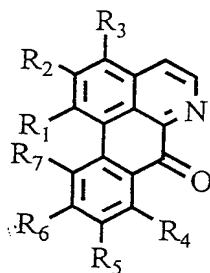
用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物又可为
5 式 V 化合物:



V

其中, R_1 、 R_2 为 H、acyl、Me、Et、ⁿPr 或 ⁱPr; 及 R_3 、 R_4 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN。

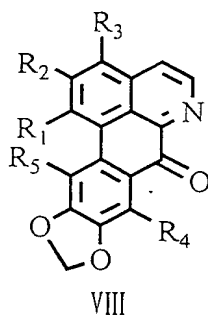
10 用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物又可为式 VII 化合物:



VII

其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 为 H、OH、OAc、OMe、OEt、OⁿPr 或 OⁱPr; R_3 、 R_4
15 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NO₂ 或 CN; R_7 为 H、O-acyl、OMe。

用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物又可为式 VIII 化合物:



其中, R_1 、 R_2 为 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr 或 OⁱPr; R_3 、 R_4 为 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NO₂ 或 CN; 及 R_5 为 H、OH、O-acyl、OMe。

5 其中, 前述式 I 至式 VIII 所示的化合物可与药学上可接受的载体或赋形剂共存其中, 且此载体或赋形剂通常为乳糖。

以上所述的几种不同结构的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物皆可用于治疗哺乳动物或人类的缺血性疾病, 该缺血性疾病包括缺血性脑中风、缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病或缺血性肠病变等。

在详述了阿朴芬及酮基阿朴芬化合物的各种类型及其所达成目的和功效之后, 接续以下列几个具体实施例来说明该阿朴芬及酮基阿朴芬化合物的制备方法。

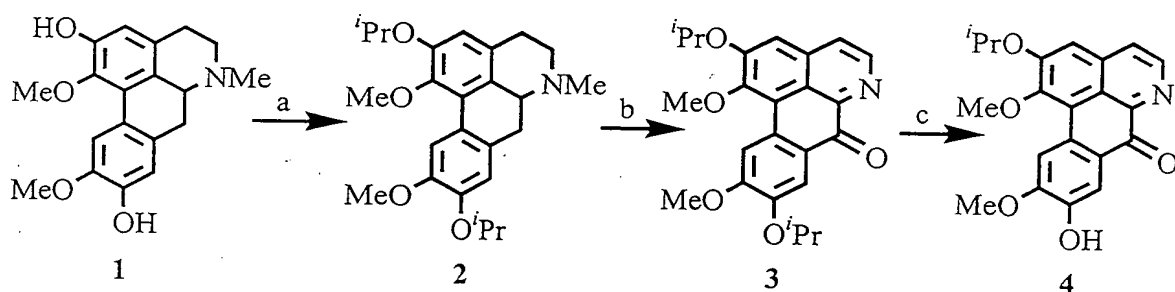
15 实施例 1: 2, 9-二异丙氧基 1, 10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (3) (2, 9-Diisopropoxy-1, 10-dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 的化合物, 其中 $R_1=R_6=OMe$, $R_2=R_5=O^iPr$, $R_3=R_4=R_7=H$) 及 9-羟基 2-异丙氧基 1, 10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (4) (9-Hydroxy-2-isopropoxy-1, 10-dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 的化合物, 其中 $R_1=R_6=OMe$, $R_2=O^iPr$, $R_3=R_4=R_7=H$, $R_5=OH$) 的制备:

20 1、2, 9-二异丙氧基 1, 10-二甲氧基 N-甲基阿朴芬 (2) (2, 9-Diisopropoxy-1, 10-dimethoxy-N-methylaporphine, 式 I 的化合物, 其中 $R_1=R_7=OMe$, $R_2=R_6=O^iPr$, $R_3=R_5=R_8=H$, $R_4=Me$) 的制备

将波尔定碱 (Boldine) (1, 1.63 克, 5 毫摩尔)、无水酒精 (50 毫升) 及无水碳酸钾 (3.0 克) 依序加入 250 毫升的圆底瓶中, 在 70°C 油浴

中搅拌, 再于 1 小时内逐滴加入碘化异丙烷 (3.4 克 20 毫摩尔) 的无水酒精 (10 毫升) 溶液, 反应 8 小时后冷却至室温, 滤除无机沉淀物, 再以酒精洗涤沉淀物, 将滤液与洗涤液减压浓缩后的残留物溶于氯仿 (150 毫升), 以 10% 氢氧化钠水溶液 (50 毫升) 及水 (50 毫升 x3) 连续抽提杂质, 氯仿层再以无水硫酸钠脱水、减压浓缩, 所得残留物再以碱性铝矾胶管柱层析分离, 以氯仿冲提得 2,9-diisopropoxy-1,10-dimethoxy -*N*-methylaporphine (2) (1.54 克, 75% 产率):

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.40 (6H, d, $J = 6.1$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 1.43 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 2.52 (3H, s, NCH_3), 3.64 (3H, s, 1-OCH_3), 3.85 (3H, s, 10-OCH_3), 4.54 (1H, m) and 4.59 (1H, m) ($2 \times \text{OCH}$), 6.56 (1H, s, H-3), 6.76 (1H, s, H-8), 8.06 (1H, s, H-11).



2、2,9-二异丙氧基 1,10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (3) (2,9-diisopropoxy-1,10-dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 的化合物, 其中, $\text{R}_1=\text{R}_6=\text{OMe}$, $\text{R}_2=\text{R}_5=\text{O}^i\text{Pr}$, $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_7=\text{H}$) 的制备

将四乙酸铅 (95%, 483 毫克, 1.09 毫摩尔) 加入化合物 (2) (137 毫克, 330 微摩尔) 的乙酸溶液 (5 毫升) 中, 在室温下搅拌反应 12 小时。反应液加入水 (150 毫升), 以氯仿 (50 毫升 x 4) 连续抽提, 氯仿层再以饱和碳酸氢钠水溶液 (50 毫升)、10% 硫代硫酸钠水溶液 (50 毫升) 及水 (50 毫升 x 2) 连续洗涤, 再以无水硫酸钠脱水、减压浓缩, 所得残留物再以硅胶管柱层析分离, 以氯仿冲提得 2,9-diisopropoxy-1,10-dimethoxy-7-oxoaporphine (3) (68 毫克, 50% 产率): m. p. $82\text{-}84^\circ\text{C}$;

IR (KBr) ν_{\max} 2976, 2933, 1654, 1590, 1563, 1508, 1459, 1431, 1416, 1359, 1296, 1275, 1241, 1216, 1138, 1110, 1057, 1009, 9956, 925, 887, 864, 782 cm^{-1} ;

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (6H, d, $J = 6.1$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 1.53 (6H, d, $J = 6.1$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 4.01 (3H, s, 1-OCH_3), 3.85 (3H, s, 10-OCH_3), 4.87 (2H, m) ($2 \times \text{OCH}$), 7.79 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-4), 7.96 (1H, s, H-8), 8.75 (1H, s, H-11), 8.86 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-5);

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.7 (2C, q), 21.9 (2C, q), 56.0 (q), 60.4 (q), 70.9 (d), 71.2 (d), 107.2 (d), 110.6 (d), 112.2 (d), 120.2 (s), 121.3 (s), 123.2 (d), 126.7 (s), 128.8 (s), 135.4 (s), 14.5 (9d), 145.3 (s), 147.8 (s), 151.5 (s), 154.6 (s), 154.8 (s), 181.3 (s);

ESI MS (positive): $[\text{M}+\text{H}]^+ 408$.

3、9-羟基 2-异丙氧基 1,10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (4) (9-hydroxy-2-isopropoxy-1,10-dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 的化合物, 其中 $\text{R}_1=\text{R}_6=\text{OMe}$, $\text{R}_2=\text{R}_5=\text{O}^i\text{Pr}$, $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_7=\text{H}$) 的制备

取化合物 (3) (50 毫克) 的乙酸-硫酸溶液 (96:4, 5 毫升), 此反应液在氮气下加热回流 1 小时。于冷却至室温后减压浓缩、中和 (氨水)、氯仿抽提 (100 毫升 $\times 2$), 氯仿层再以水 (50 毫升 $\times 2$) 洗涤、无水硫酸钠去水、减压浓缩, 所得残留物再以硅胶管柱层析分离, 以氯仿-甲醇 (97:3) 冲提得棕色 9-hydroxy-2-isopropoxy-1,10-dimethoxy-7-oxoaporphine (4) (10 毫克, 22% 产率): m. p. 240-242°C;

IR (KBr) ν_{\max} 3422, 3008, 2977, 2932, 1728, 1651, 1593, 1513, 1461, 1417, 1380, 1351, 1280, 1247, 1213, 1149, 1116, 1059, 1013, 932, 894, 866, 822 cm^{-1} ;

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 1.51 (6H, d, $J = 6.0$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 4.01 (3H, s, OCH_3), 4.02 (3H, s, OCH_3), 4.87 (1H, m, OCH), 7.25 (1H, s, H-3),

7.74 (1H, s, H-8), 7.83 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-4), 8.63 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-5), 8.68 (1H, s, H-11);

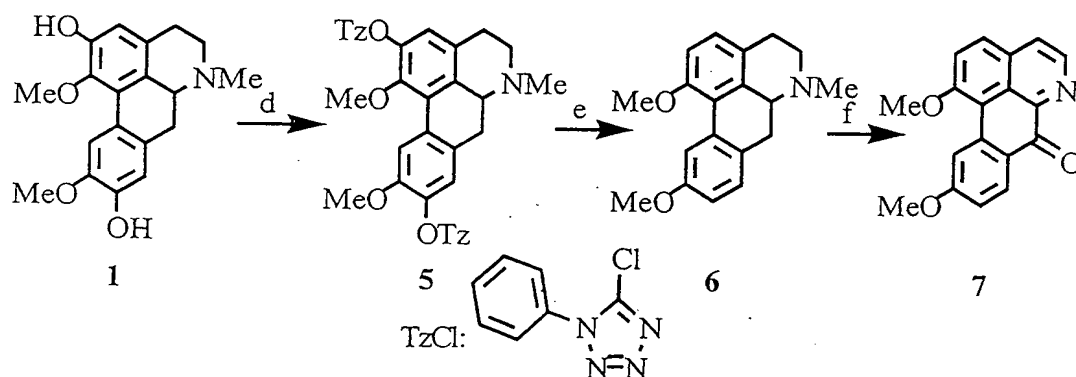
ESI MS (positive): $[M+H]^+$ 366.

实施例 2: 1,10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (7) (1,10-Dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 化合物, 其中 $R_1=R_6=Me$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_7=H$) 的制备

1、1,10-二甲氧基 N-甲基阿朴芬 (6) (1,10-dimethoxy-N-methylaporphine, 式 I 化合物, 其中 $R_1=R_7=OMe$, $R_2=R_3=R_5=R_6=R_8=H$, $R_4=Me$) 的制备

于圆底瓶 (500 毫升) 中依序加入波尔定碱 (boldine, (1), 10.0 克, 30.58 毫摩尔)、氰乙烷 (350 毫升)、无水碳酸钾 (8.4 克, 61 毫摩尔) 及 5-chloro-1-phenyltetrazole (TzCl, 12.14 克, 33.64 毫摩尔), 此混合物加热回流反应 24 小时。冷却后滤除无机盐, 再以氰乙烷洗涤沉淀物, 将滤液与洗涤液减压浓缩后的残留物溶于氯仿 (400 毫升), 以水 (200 毫升 $\times 2$) 抽提杂质, 氯仿层再以无水硫酸钠脱水、减压浓缩, 所得残留物再以硅胶 (500 克) 管柱层析分离, 以氯仿-甲醇 (99:1) 冲提得 2,9-O-bis (1-phenyltetrazol-5-yl) -1,10-dimethoxy-N-methylaporphine (5) (18 克, 96% 产率):

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.55 (3H, s, NCH_3), 3.46 (3H, s, $1-OCH_3$), 3.76 (3H, s, $10-OCH_3$), 7.19 (1H, s, H-3), 7.31 (1H, s, H-8), 7.42-7.60 (6H, m) and 7.83-7.87 (4H, m) ($C_6H_5 \times 2$), 8.04 (1H, s, H-11).



于化合物(5) (8 克) 的乙酸溶液 (55 毫升) 中, 加入 10% 钼/活性炭 (1 克), 于 120psi 氢气及 50°C 下反应三天。冷却后, 以硅藻土滤除钼/活性炭, 用氯仿洗涤滤除物, 将滤液与洗涤液减压浓缩后的残留物溶于氯仿 (200 毫升), 以 10% 氢氧化钠水溶液 (50 毫升 \times 2) 及水 (100 毫升 \times 2) 抽提杂质, 氯仿层以无水硫酸钠去水、减压浓缩, 残留物以硅胶管柱层析分离, 以氯仿-甲醇 (98: 2) 冲提得 1,10-dimethoxy-*N*-methylaporphine (6) (4.12 克, 90% 产率):

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 2.55 (3H, s, NCH_3), 3.82 (3H, s, 1- OCH_3), 3.85 (3H, s, 10- OCH_3), 6.76 (1H, dd, $J = 2.7, 8.3$ Hz, H-9), 6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2), 7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3), 7.16 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-8), 7.89 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-11);

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 28.3 (t), 33.6 (t), 43.7 (q), 53.1 (t), 55.3 (q), 55.7 (q), 63.1 (d), 110.9 (d), 112.1 (d), 114.7 (d), 121.9 (s), 125.2 (s), 128.1 (d), 128.3 (s), 128.6 (d), 133.0 (s), 136.2 (s), 155.0 (s), 158.1 (s)。

2、1,10-二甲氧基 7-酮基阿朴芬 (7) (1,10-Dimethoxy-7-oxoaporphine, 式 VII 化合物, 其中 $\text{R}_1=\text{R}_6=\text{Me}$, $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{R}_7=\text{H}$) 的制备

将三乙酸铊 (thallium triacetate) (816 毫克, 2 毫摩尔) 加入化合物(6) (148 毫克, 0.5 毫摩尔) 的乙酸溶液 (10 毫升) 中, 在 70°C 下搅拌反应 1 小时。反应液加入水 (150 毫升), 以氯仿 (50 毫升 \times 4) 连续抽提, 氯仿层再以饱和碳酸氢钠水溶液 (50 毫升)、10% 硫代硫酸钠水溶液 (50 毫升) 及水 (50 毫升 \times 2) 连续洗涤, 再以无水硫酸钠脱水、减压浓缩, 所得残留物再以硅胶管柱层析分离, 以氯仿-甲醇 (99:1) 冲提得 1,10-dimethoxy-7-oxoaporphine (7) (100 毫克, 69% 产率):

m. p. 162-164°C;

IR (KBr) ν_{\max} 2934, 2839, 1644, 1617, 1584, 1540, 1484, 1455, 1406, 1373, 1351, 1325, 1255, 1169, 1119, 1048, 1025, 985, 859, 810 cm^{-1} ;

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, δ_{CHCl_3} 7.24) δ 3.79 (3H, s, 10- OCH_3), 4.04 (3H, s, 1- OCH_3), 6.88 (1H, dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, H-9), 7.47 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2), 7.73 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-4), 7.77 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 8.29 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-8), 8.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-11), 8.64 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-5);

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, δ_{CDCl_3} 77.0) δ 55.2 (q), 56.3 (q), 112.3 (s), 113.5 (d), 113.8 (d), 119.7 (d), 124.9 (d), 125.0 (s), 125.9 (s), 130.7 (d), 130.8 (d), 132.3 (s), 136.6 (s), 141.8 (d), 144.6 (s), 159.0 (s), 164.2 (s), 180.7 (s);

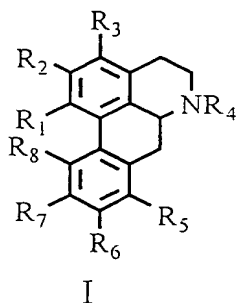
ESI MS (positive): $[\text{M}+\text{Na}]^+ 314$.

本发明提供一种利用保存或增加内皮性一氧化氮合成酶 (eNOS) 的机制用以预防及治疗局部缺血性疾病的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 其使所有缺血性疾病都可藉由 eNOS 的保存与增加来有效达到预防及治疗的功效; 且在治疗缺血性疾病时, 不会使病人有记忆丧失、体温下降等现象的副作用, 使本发明可达到更完善、无副作用的功效; 而利用使血管放松并扩张的方式, 比现有技术利用将已阻塞的血栓溶解掉而打通血路的方法具有更佳功效。

以上描述了本发明的优选实施方式, 然其并非用以限定本发明。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

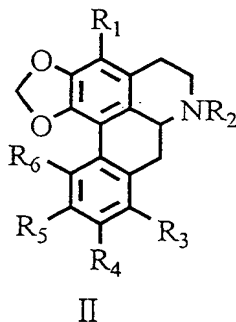
权利要求

1、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，为具有式 I 结构的化合物：



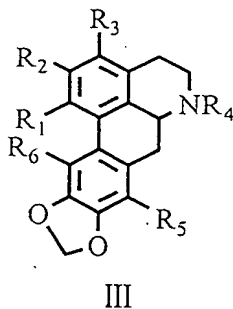
5 其中， R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr， R_3 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂或 CN， R_4 选自 Allyl (烯丙基) 或 C_nH_{2n+1}且 $n \geq 0$ ， R_8 选自 H、OH、OMe。

2、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，为具有式 II 结构的化合物：



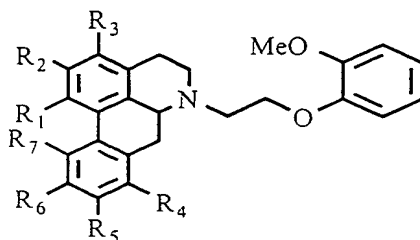
10 其中， R_1 、 R_3 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂或 CN， R_2 选自 allyl 或 C_nH_{2n+1}，且 $n \geq 0$ ， R_7 选自 H、OH、OMe， R_4 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr， R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

3、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，为具有式 III 结构的化合物：



其中, R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr, R_3 、 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN, R_4 选自 Allyl 或 C_nH_{2n+1} 且 $n \geq 0$, R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

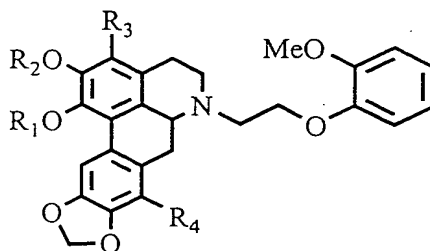
4、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 为具有式IV结构的化合物:



IV

其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、OⁿPr、OⁱPr, R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN, R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

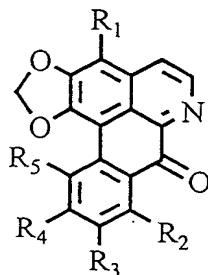
10 5、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 为具有式V结构的化合物:



V

其中, R_1 、 R_2 选自 H、acyl、Me、Et、ⁿPr 或 ⁱPr, R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、NH₂、NO₂ 或 CN。

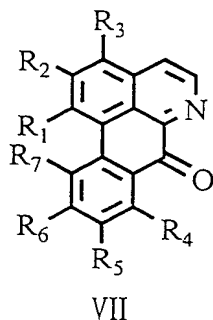
15 6、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 为具有式VI结构的化合物:



VI

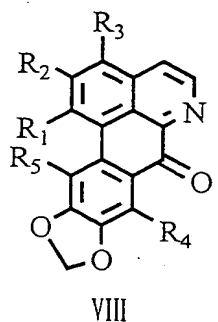
其中, R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NO_2 或 CN, R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 、或 O^iPr , 及 R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

7、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 为具有式VII结构的化合物:



其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 或 O^iPr , R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NO_2 或 CN, R_7 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

10 8、一种阿朴芬及酮基阿朴芬化合物, 为具有式VIII结构的化合物:



15 其中, R_1 、 R_2 选自 H、OH、O-acyl、OMe、OEt、 O^nPr 或 O^iPr , R_3 、 R_4 选自 H、OH、O-acyl、OMe、F、Cl、Br、 NO_2 或 CN, R_5 选自 H、OH、O-acyl、OMe。

9、权利要求 1-8 任一项所述阿朴芬或酮基阿朴芬化合物在制备用于预防和治疗局部缺血性疾病的药物中的用途。

10、权利要求 1-8 任一项所述阿朴芬或酮基阿朴芬化合物在制备用于治疗哺乳动物或人类的缺血性疾病的药物中的用途。

11、权利要求 10 所述的用途，其中，所述缺血性疾病包括缺血性脑中风、缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病及缺血性肠病变。

12、权利要求 1-8 任一项所述阿朴芬或酮基阿朴芬化合物用于治疗
5 哺乳动物或人类的缺血性疾病。

13、权利要求 12 所述的用途，其中，所述缺血性疾病包括缺血性脑中风、缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病及缺血性肠病变。

14、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有
10 效量的式 I 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

15、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 II 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

16、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 III 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

15 17、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 IV 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

18、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 V 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

19、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有
20 效量的式 VI 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

20、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 VII 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

21、用于预防及治疗局部缺血性疾病的药物组合物，其包括治疗有效量的式 VIII 的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

摘 要

本发明提供一种用以制备预防、治疗局部缺血性疾病的药物的阿朴芬及酮基阿朴芬化合物，该化合物的药用机制为保存或增加内皮性一氧化氮合成酶（eNOS），因而可用以制备预防、治疗哺乳动物或人类的局部缺血性疾病的药物，所述的缺血性疾病包括缺血性脑中风、缺血性脑血栓症、缺血性脑栓塞症、缺氧缺血性脑症、缺血性心脏病或缺血性肠病变等。

1/4

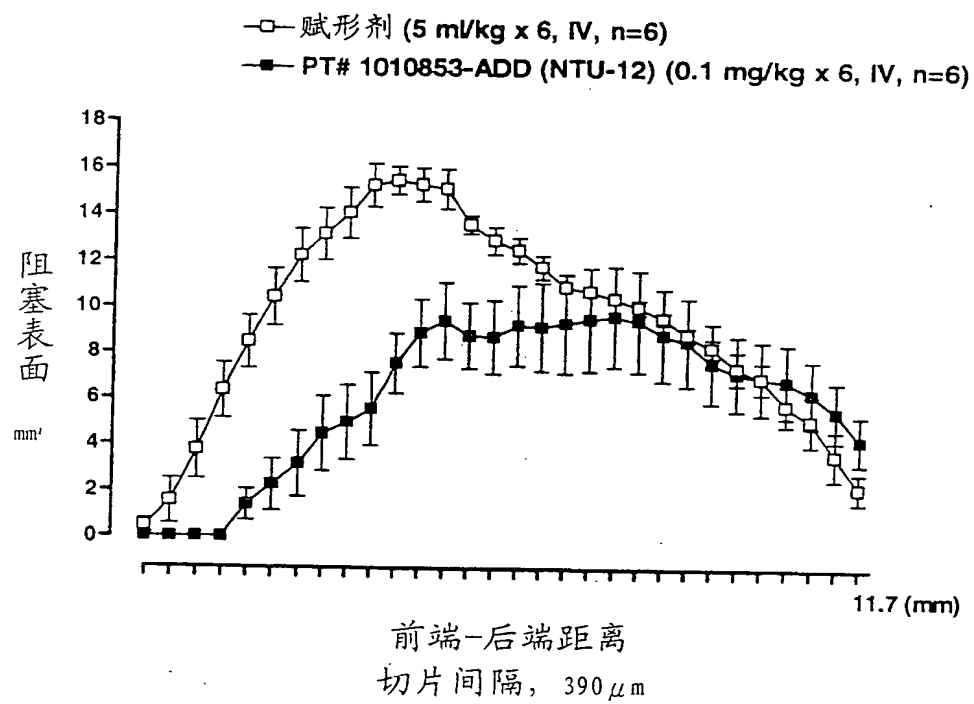


图 1

2/4

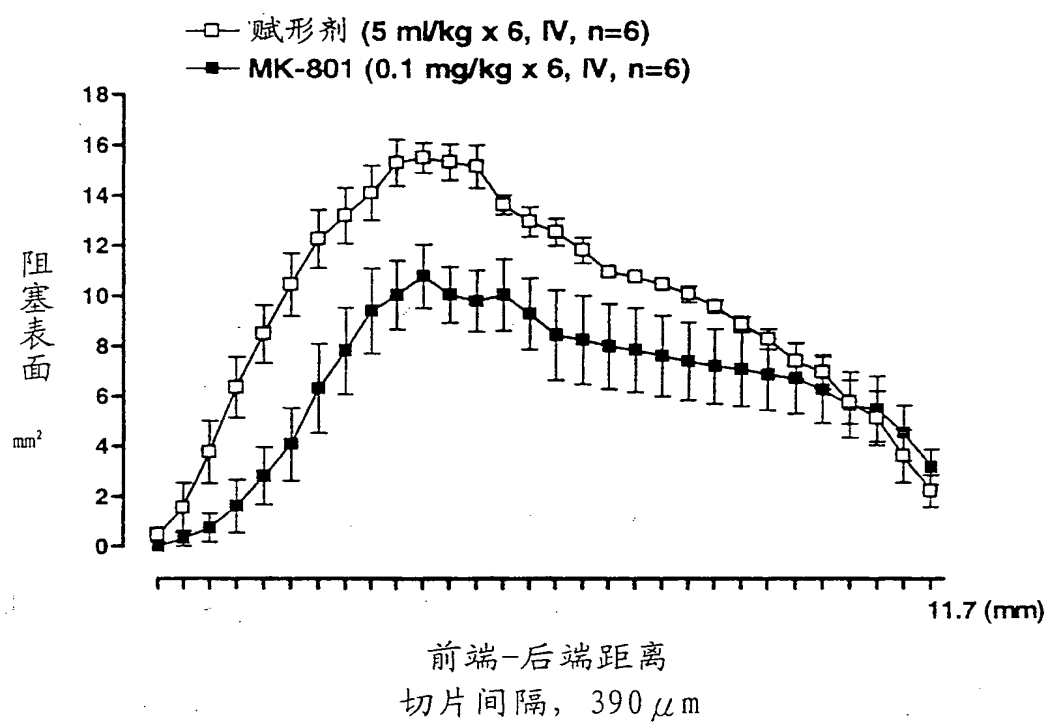


图 2

3/4

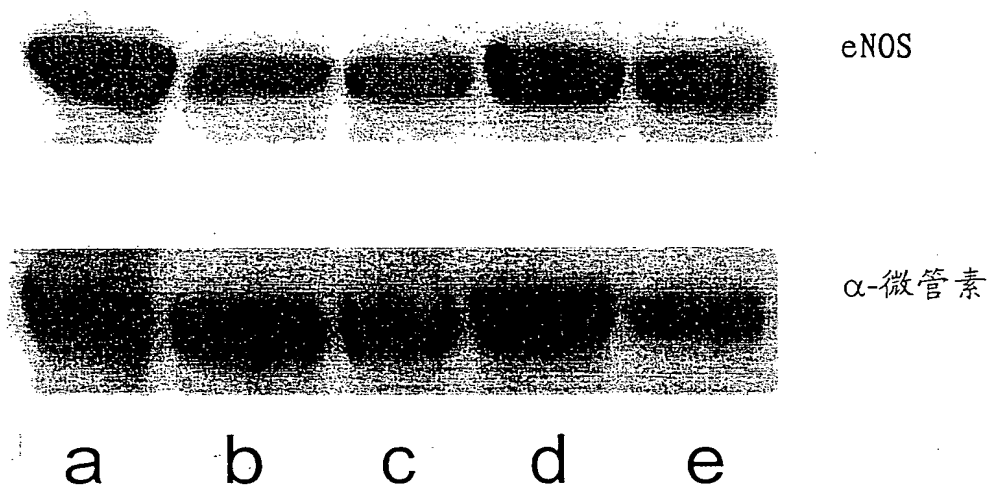


图 3

4/4

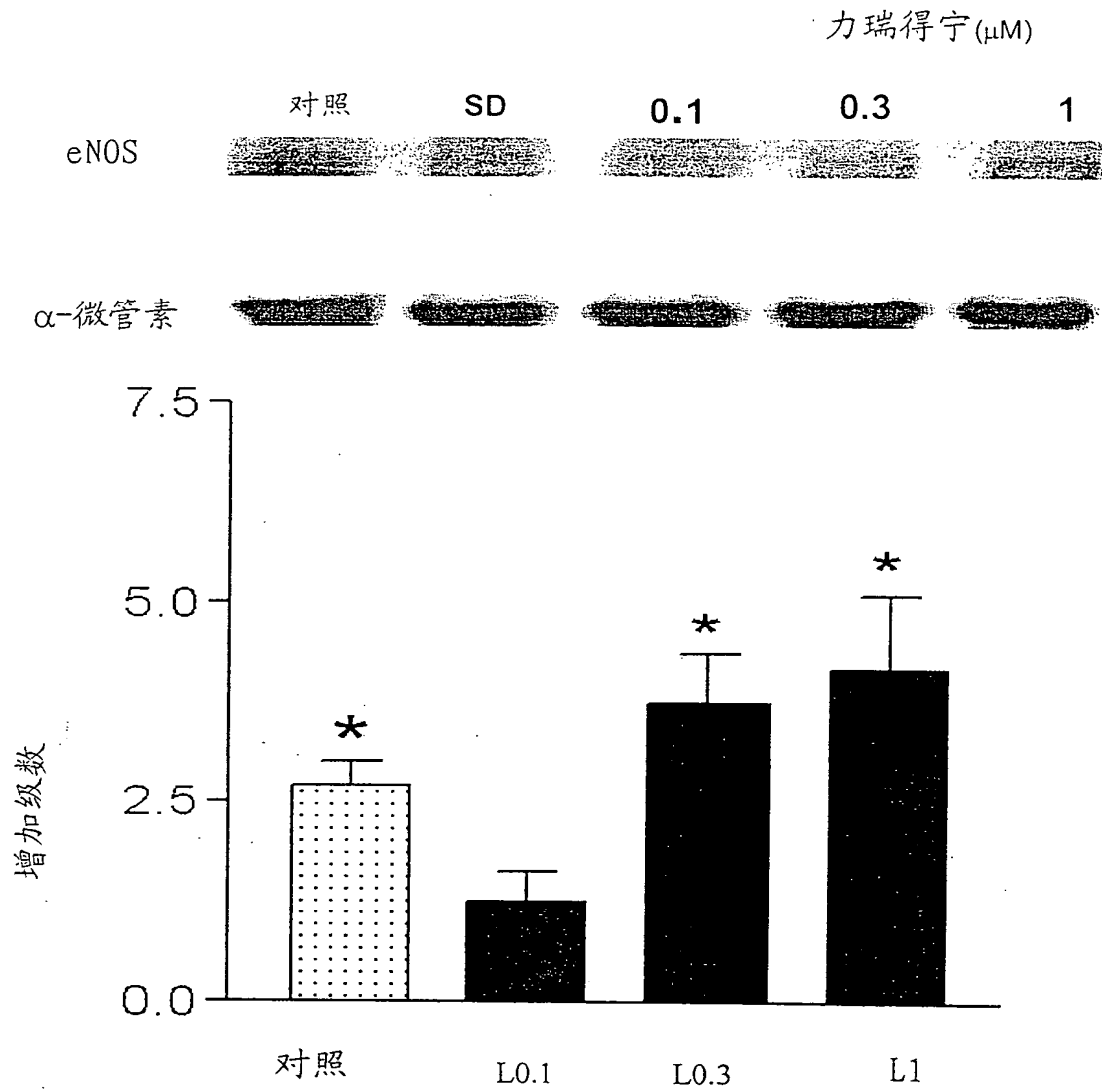


图 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.